

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-289699

(43)Date of publication of application : 05.11.1996

(51)Int.CI.

A01K 67/027
C12N 5/06
C12N 15/00

(21)Application number : 07-124297

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES INST
KAKIMOTO KIICHI

(22)Date of filing : 24.04.1995

(72)Inventor : KAKIMOTO KIICHI
SAKATA ATSUKO
SAKATA KIYOAKI
KAN TAIRA
OMURA TAKAFUMI

(54) MODEL ANIMAL FOR AUTOIMMUNE DISEASE AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an autoimmune disease model animal useful for a morbid state investigation and the development of a treating agents by culturing a pathological lymphocyte derived from an autoimmune disease patient together with a T-lymphocyte activating material to obtain an activated T-lymphocyte and transferring the activated lymphocyte into an immunodeficiency model animal.

CONSTITUTION: This autoimmune disease model animal such as an autoimmune disease model mouse having the symptom of a disease such as synovial membrane proliferation, fibrosis or phagedena in bone and cartilage peculiar to serious autoimmune diseases is obtained by transferring an activated T-lymphocyte obtained by culturing a pathological T-lymphocyte such as a synovial T-lymphocyte (SFT) derived from an autoimmune disease patient such as RA patient together with a T-lymphocyte activating material as an autoantigen such as collagen type II (C II) capable of introducing autoimmunization which causes autoimmune diseases into an immunodeficiency model animal.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-289699

(43)公開日 平成8年(1996)11月5日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 01 K 67/027			A 01 K 67/027	
C 12 N 5/06 15/00		9281-4B 9162-4B	C 12 N 5/00 15/00	E Z

審査請求 未請求 請求項の数16 FD (全 6 頁)

(21)出願番号 (22)出願日 特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年10月25日 日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録 第24巻」に発表	(71)出願人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 (71)出願人 595073362 垣本 純一 福岡県北九州市八幡西区光貞台2-11-4 (72)発明者 垣本 純一 福岡県北九州市八幡西区光貞台2-11-4 (72)発明者 坂田 敦子 熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学内 (72)発明者 坂田 研明 熊本県熊本市本荘1-1-1 熊本大学内
---	---

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 自己免疫疾患モデル動物及びその作製方法

(57)【要約】

【目的】 自己免疫疾患の病態研究や治療薬の開発に有用な自己免疫疾患モデル動物及びその作製方法を提供する。

【構成】 ヒト自己免疫疾患患者由来のTリンパ球をマイトジエン(PHA、抗T細胞抗体等)や自己抗原(II型コラーゲン)等のTリンパ球活性化物質と共に培養することにより得られる活性化Tリンパ球を免疫不全モデル動物に移入することにより、ヒト自己免疫疾患特有の症状を有するモデル動物を作製する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 重篤な自己免疫疾患特有の病状を有する自己免疫疾患モデルマウス。

【請求項2】 当該自己免疫疾患が慢性関節リウマチ(RA)である請求項1記載の自己免疫疾患モデルマウス。

【請求項3】 当該病状が滑膜増殖、纖維化、または骨及び軟骨の侵蝕である請求項1または2記載の自己免疫疾患モデルマウス。

【請求項4】 自己免疫疾患患者由来の病原性Tリンパ球をTリンパ球活性化物質と共に培養することを特徴とし、自己免疫疾患特有の病状を惹起することが可能な活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項5】 当該自己免疫疾患患者が、RAである請求項4記載の活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項6】 当該病原性Tリンパ球が、RA患者由来の関節滑液Tリンパ球(SFT)である請求項4記載の活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項7】 当該Tリンパ球活性化物質が、マイトジエンである請求項4記載の活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項8】 当該マイトジエンが、抗T細胞抗体である請求項7記載の活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項9】 当該マイトジエンが、フィトヘマグルチニン(PHA)のようなT細胞レクチンである請求項7記載の活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項10】 当該Tリンパ球活性化物質が、自己免疫疾患の原因となる自己抗体産生を誘導させうる自己抗原である請求項4記載の活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項11】 当該自己抗原が、II型コラーゲン(CII)である請求項10記載の活性化Tリンパ球の作製方法。

【請求項12】 請求項4から11のいずれかに記載の作製方法により得られる活性化Tリンパ球を免疫不全モデル動物に移入することを特徴とする自己免疫疾患モデル動物の作製方法。

【請求項13】 当該活性化Tリンパ球の免疫不全モデル動物への移入経路が、腹腔内投与であることを特徴とする請求項12記載の自己免疫疾患モデル動物の作製方法。

【請求項14】 当該活性化Tリンパ球の免疫不全モデル動物への移入経路が、腹腔内投与及び膝関節への直接投与の併用投与であることを特徴とする請求項12記載の自己免疫疾患モデル動物の作製方法。

【請求項15】 当該免疫不全モデル動物が重症複合免疫不全(SCID)マウスである請求項12から14のいずれかに記載の自己免疫疾患モデル動物の作製方法。

【請求項16】 請求項12から15のいずれかに記載の方法により得られる自己免疫疾患モデル動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、自己免疫疾患モデル動物及びその作製方法に関する。さらに詳細には、本発明は、ヒトの自己免疫疾患の発現に直接関与する病原性Tリンパ球をTリンパ球活性化試薬と共に培養することにより得られる活性化Tリンパ球並びに当該活性化Tリンパ球を免疫不全モデル動物へ移入することによって得られる自己免疫疾患を発症した自己免疫疾患モデル動物及びその作製方法に関する。

【0002】

【従来技術】 本発明に係る自己免疫疾患モデル動物とは、免疫不全モデル動物に病原性Tリンパ球を移入した際、当該モデル動物が免疫不全であるために当該Tリンパ球を拒絶せずに受け入れて、ヒトのTリンパ球によってその免疫系が再構成された結果、ヒトの自己免疫疾患が発症した動物のことである。

【0003】 従来より、重症複合免疫不全(SCID)マウスにヒトの造血幹細胞やリンパ球を移入して、ヒトの血液細胞で再構成する試みが諸々で行われ、SCID-huとして、種々報告されている[J.R. Frey et al., J. Exp. Med., 175, p1067(1992); G.M. Fulop et al., J. Immunol., 136, p4438(1986)]。また、正常細胞のかわりに、ヒトの自己免疫疾患に関わるリンパ球や癌細胞を移入してヒトの病気を再現して疾患モデルマウスとして用いようという試みも行われている[T.D. Gepert et al., Arthritis Rheum., 33, p599(1990)]。しかし、リンパ球移入によるヒトの自己免疫疾患の再現は必ずしも成功しているとは言い難い。

【0004】 例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)患者のリンパ球をSCIDマウスに移入した報告では、種々の自己抗体の產生は認められるが、典型的なヒトのSLEに特徴的な腎病変や血管病変の再現には成功していない[M.A. Duchosal et al., J. Exp. Med., 172, p985(1990)]。

【0005】 一方、ヒトの多発性硬化症(MS)の患者の髄液リンパ球をSCIDマウスの脳室局所に移入してMS疑似の四肢の麻痺症状を誘導するのに成功した報告がある[Y. Saeki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, p6157(1992)]。しかしながら、ヒトの慢性関節リウマチ(RA)患者の関節液中のTリンパ球をSCIDマウスの膝関節局所へ注入しても、ごく軽い滑膜炎が認められるのみであった【佐伯ら、日本免疫学会総会・学術集会記録 第22巻, p400(1992)】。

【0006】 このように、RAにしばしば見られる滑膜の肥厚、パンヌスの形成、骨、軟骨の破壊にまで到るような重篤な増殖性滑膜炎の誘導は困難とされ、これではヒトのRAモデル動物の確立には程遠いと考えられてきた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 上述したように、従来

の自己免疫疾患モデル動物は、自己免疫疾患、特にRAの疾患モデル動物としては不充分であった。本発明は、この欠点を克服し、よりヒトの病態に近い疾患モデル動物並びにその作製方法を確立することを目的とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】このような状況下において、本発明者らは鋭意研究を行なった結果、自己免疫疾患患者由来の病原性Tリンパ球をTリンパ球活性化物質と共に培養後、得られる活性化Tリンパ球を免疫不全モデル動物に移入することにより重篤な自己免疫疾患の病態を発症するモデル動物の作製に成功し、本発明を完成するに至った。

【0009】さらに、細胞移入の経路としては、腹腔内投与が有効であるが、必要に応じて膝関節への直接投与を併用することにより、さらに効率よく目的の自己免疫疾患モデル動物を作製することができる。

【0010】

【発明の構成】本発明の自己免疫疾患モデル動物を作製するためには、まず、自己免疫疾患患者由来の病原性Tリンパ球が使用される。例えば、慢性関節リウマチ(RA)の発症モデル動物を作製する場合、RA患者の関節滑液Tリンパ球(SFT)を使用することが好ましい。当該Tリンパ球は、自己免疫疾患患者より採取される関節滑液を常法、例えばヒツジ赤血球ロゼット法に従って精製することにより得られる。

【0011】しかしながら、得られた精製病原性Tリンパ球をそのまま免疫不全モデル動物に移入しても、所望とする疾患の病状を示すモデル動物を得ることはできない。そこで、当該Tリンパ球を免疫不全モデル動物に移入する前に、種々のTリンパ球活性化物質と共に培養することにより、活性化Tリンパ球を作製する。使用されるTリンパ球活性化物質としては、T細胞レクチンまたは抗T細胞抗体等のマイトジエン並びにII型コラーゲン(CII)等の自己抗原が挙げられる。

【0012】マイトジエン(分裂促進因子)とは、リンパ球を活性化し、細胞分裂を誘導促進する性質を有する物質である。本発明で使用されるマイトジエンの好適な一例であるT細胞レクチンは、Tリンパ球の表面に存在する糖鎖と結合する性質を有している。T細胞レクチンをTリンパ球と混合・培養すると、T細胞レクチンがTリンパ球表面に存在する糖鎖と結合し、Tリンパ球の分裂増殖が誘起されることにより、Tリンパ球が活性化される。T細胞レクチンの一例としては、フィトヘマグルチニン(PHA)が挙げられる。

【0013】また、本発明で使用されるマイトジエンの他の好適な一例として、抗T細胞抗体が挙げられる。さらに好ましくは、抗CD3抗体が挙げられる。ここで、CD3は、Tリンパ球表層において抗原認識能を有するT細胞レセプターと非共有的に結合してT細胞レセプタ

ー複合体を形成し、抗原認識に係る情報伝達開始の一員を担っている分子群である。このCD3に対して特異的な抗体である抗CD3抗体を、Tリンパ球と反応させると、Tリンパ球表層に存在するCD3が刺激を受け、Tリンパ球が分裂増殖を誘起されることにより活性化される。

【0014】また、他の好適なTリンパ球活性化物質として、自己抗原が挙げられる。自己抗原とは、身体の成分であり、自己免疫疾患の原因とされる自己抗体産生を誘導することのできる抗原である。本発明で用いられる自己抗原の好適な一例としては、例えば、自己免疫疾患がRAの場合、RAの自己抗原の1つと推定されているII型コラーゲン(CII)を使用することができる。CIIをRA患者由来の関節滑液T細胞(SFT)と共に培養すると、CIIはある特定のTリンパ球と特異的に反応し、当該Tリンパ球の分裂増殖が活発化されることにより、SFTが活性化させられる。

【0015】上記の種々のTリンパ球活性化物質を自己免疫疾患患者由来の病原性Tリンパ球と培養することにより活性化Tリンパ球が得られる。そして、当該活性化Tリンパ球を免疫不全モデル動物に移入することにより、所望の自己免疫疾患の病状を発症するモデル動物の作製が可能となる。

【0016】本発明により使用される免疫不全モデル動物の一例として、重症複合免疫不全(SCID)マウスが挙げられる。

【0017】本発明者の成績では、たとえRAの患者のSFTを使用しても、PHAなどによってあらかじめ活性化していないSFTを移入した場合、強い関節炎は起こらない。従って、移入前のSFTの活性化は関節炎発症のための必須の要件と考えられる。また、正常人やRA患者の末梢血Tリンパ球(PBT)を刺激して移入しても関節炎は起らず、非リウマチ性の変形性関節炎(OA)患者の滑液リンパ球(SF)を刺激後移入しても関節炎は発症しない。これらの結果より、RA患者のSFTを培養刺激して移入することが重要で、関節の自己抗原に反応性を有するTリンパ球がRA患者の関節中に集まっており、それを活性化することが必要条件と推測される。これはRAに限らずその他の多くの自己免疫疾患のモデル動物作製にも適用できる非常に有効な方法と考えられる。

【0018】一方、RA患者由来のSFTをTリンパ球活性化物質で刺激後移入した場合においても、RA患者の個人差や移入する細胞数により、強い関節炎を発症しない場合がある。移入細胞の数が多いとき($\sim 1 \times 10^7$)は、活性化SFTの腹腔内投与のみでも強い関節炎を発症するものがある。しかし、移入するSFTの細胞数が $2 \sim 5 \times 10^6$ 細胞のように少ない場合、腹腔内投与のみでは弱い関節炎しか発症しないことがある。そこで、有効にかつ強い関節炎を発症させるためには、腹腔

内投与と共に関節腔内直接投与を併用することが好ましい。

【0019】上述したように、本発明により、重篤な自己免疫疾患特有の病状を有する自己免疫疾患モデル動物を作製することができた。特に、慢性関節リウマチ(RA)特有の病状、すなわち滑膜増殖、纖維化、または骨及び軟骨の侵蝕等を呈するモデルマウスを作製することができた。

【0020】本発明者らの成績では、活性化SFTを移入することによりSCIDマウスに誘導された関節炎局所には、ヒトのTリンパ球特異的単クローニング抗体MT-1(バイオサイエンス・プロダクツ社)と反応するTリンパ球のみが増殖浸潤していた。さらに、SFTを直接注入した右膝関節のみならず無関係の左膝関節及び足関節にも強い関節炎の発症が認められた。これらの結果より、認められた関節炎はヒトのSFTにより惹起されているものであることが明らかになった。さらに、その関節炎は細胞の注入局所の物理的障害によるものではなく、ヒトRAのそれによく似た多発性の関節炎であることが示された。なお、SCIDマウスでしばしば問題となるGVHDの所見は調べた諸臓器(肝、腎、耳下腺、小腸など)で認められなかった。

【0021】以下、実施例にそって本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0022】

【実施例】

1) RA患者関節滑液Tリンパ球(SFT)の分離

RA患者の関節液15~40mlを採取する。関節液中に含有されるTリンパ球をヒツジ赤血球(SRBC)ロゼット法にて精製する。すなわち、一晩氷中に保存した関節液にヒアルロニダーゼ粉末を約0.2~0.3g加えて良く混和し、37℃温水中で振盪しながら30分~1時間加温する。メッシュで細胞を濾過した後、RPMI培養液を加えて2回遠心(1600rpm、10分)によって洗浄し、上清を除く。生じた沈渣(Tリンパ球含有)を混和してほぐした後、AET(2-amino ethyl isothiouronium bromide hydrochloride)処理し、10%ウシ胎児血清(FCS)加RPMI培養液中に10%となるように浮遊したヒツジ赤血球(AET-SRBC)を1ml加える。良く混和した後、1600~1800rpmで1~2分間遠心した後、そのまま氷中に1~1.5時間静置する。その後、混和してメッシュで濾過した後、試験管3~4本に各3.0mlずつ分注し

ているFicoll-Conray液に2~3mlずつ重層し、室温で、1600~1800rpm、20~30分遠心する。上清を除いた後、沈渣を集めて1回RPMI液中で遠心洗浄する。この沈渣にトリス-塩酸溶液(溶血液)を加えてSRBCを溶血させ、細胞の数をカウントする。SFTの収率は、一人の患者当り $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞である。

【0023】2) SFTの活性化

SFTを10%FCS加RPMI培養液中に 5×10^6 細胞/mlに調製して、24穴の培養ディッシュにおいて各1~2mlで培養する。この時、Tリンパ球活性化物質として、10%FCS加RPMI1640培養液で調製されたPHA(ギブコ社)10μg/ml、抗CD3抗体(OKT3; ATC, Rockville, MD)5μg/ml、あるいはヒトII型コラーゲン(CII)40μg/mlを加えて、37℃、5%CO₂で3日間培養する。培養後、細胞をHanks液で2回遠心洗浄した後、移入実験に使用する。

【0024】3) 細胞の移入

2) 得られた活性化SFTを免疫不全モデル動物に入れる。免疫不全モデル動物として、重症複合免疫不全(SCID)マウスを使用した。6週令のSCIDマウスに1匹当り1~5×10⁶個の細胞を膝関節及び腹腔内に1:4の割合で移入する。活性化SFTを 2×10^7 細胞/mlに調製後、その50μlを右膝関節内に直接ツベルクリン用注射器を用いて注入する。そして200μlを腹腔内に注射する。また、RA患者由来のPHA活性化末梢血単核球(PBMC; $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個)、変形性関節症(OA)患者由来のPHA活性化関節滑液リンパ球(SF; $0.3 \sim 0.8 \times 10^6$ 個)、健常者由来のPHA活性化末梢血Tリンパ球(PBT; $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個)を上記同様にSCIDマウスに接種した。

【0025】4) 組織学的検索

細胞移入より6週間後、マウスを屠殺して、四肢の関節をホルマリンで固定した後、0.5NEDTA(pH7.4)で脱灰し、ヘマトキシリソ・エオジンで染色を行なって組織を観察する。PHA(フィトヘマグルチニン)、OKT3(抗CD3抗体)、CII(ヒトII型コラーゲン)の様な種々のTリンパ球活性化物質で活性化されたSFTを移入した結果、SCIDマウスに誘導される関節炎の組織学的所見を滑膜増殖、線維化、骨及び軟骨の侵蝕の3つの指標について検索し、その重症度を表1のスコアに基づいて図1に示した。

【0026】

【表1】

滑膜細胞の増殖	0	滑膜細胞層が1~3層
	1	" 4~5層
	2	" 6~7層
	3	" 8層以上の肥厚増生を示すもの
纖維化	0	纖維化なし
	1	軽度の纖維化を認める
	2	中度(関節組織の半ばが纖維芽細胞により置換)
	3	強度(関節組織の殆どが ")
骨・軟骨の侵蝕	0	侵蝕なし
	1	軽度の侵蝕あり
	2	中度(軟骨は中等度残存)
	3	強度(軟骨はほぼ完全に脱落)

【0027】図1から明らかなように、RA患者由来のSFTでも、移入前に活性化しない場合、関節炎特有の症状はほとんど起きない。これに対して、PHA、OKT3、CIIなどのTリンパ球活性化物質で活性化されたSFTを移入した場合、強い関節炎が誘導されることが確認された。一方、RA患者の末梢血リンパ球(PBMC)、非リウマチ性の変形性関節炎(OA)患者の滑液リンパ球(SF)や正常者の末梢血Tリンパ球(PBT)をPHA等のTリンパ球活性化物質で刺激して移入しても関節炎特有の症状はほとんど誘導されなかった。

【0028】

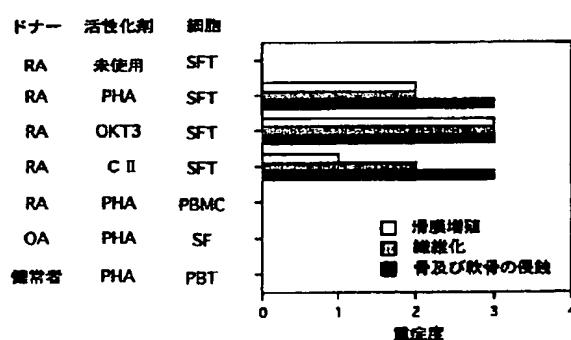
【発明の効果】 上述したように、自己免疫疾患患者由來

のTリンパ球をマイトジエンまたは自己抗原のようなTリンパ球活性化物質と共に培養することにより活性化させた後、得られる活性化Tリンパ球を免疫不全モデル動物に移入することにより、重篤な自己免疫疾患の病状を有する自己免疫疾患モデル動物を効率的に作製することが可能となった。当該モデル動物の使用は、自己免疫疾患の病態研究や治療薬のスクリーニング及び開発において極めて有効な手段となりうる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 自己免疫疾患患者由來Tリンパ球移入によるSCIDマウスの関節炎の発症性を示す。

【図1】



RA: 慢性関節リウマチ PHA: フィトヘマグルチニン SFT: 関節滑液Tリンパ球
 OA: 変形性関節症 OKT3: 抗CD3抗体 PBMC: 末梢血単核球
 CII: ヒトII型コラーゲン SF: 関節滑液リンパ球
 PBT: 末梢血Tリンパ球

フロントページの続き

(72)発明者 韓 平
熊本県熊本市本荘1-1-1 熊本大学内

(72)発明者 大村 孝文
熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学内